

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-204244

(43)Date of publication of application : 24.07.1992

(51)Int.Cl.

G01N 27/30
C12M 1/34

(21)Application number : 02-337973

(22)Date of filing : 30.11.1990

(71)Applicant : MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD

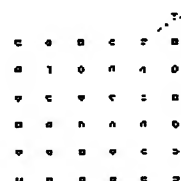
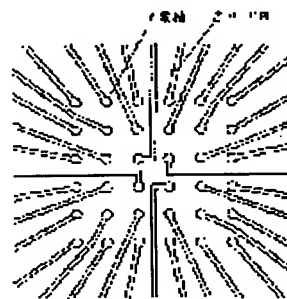
(72)Inventor : SUGIHARA HIROKAZU
MITSUMATA TADAYASU
TAKEYA MAKOTO

(54) COMPLEX ELECTRODE INCORPORATED IN ONE

(57)Abstract:

PURPOSE: To make simply multipoint concurrency measurement and make the observation of signal transfer extending among many cells by the complex electrodes incorporated in one which are provided with a wiring element radially arranging lead wires from the plural electrodes whose the distances between the nearest electrodes are equal each other, and an insulating layer having holes on the electrodes.

CONSTITUTION: Exposure is made with photoresist so as to become the pattern of electrodes 1 and lead wires 2 of the shape in which the centers of electrodes are located at the several intersections on a grid of 6×6 , center distances between the nearest electrodes of several electrodes are equal, and moreover, lead wires extend radially. Then, the photoresist is removed after ITO is made etching in the solution in which pure water 50, hydrochloric acid 50 and nitric acid 1 are mixed with volume ratio. The wiring element in which the diameter of the electrode 1 is $15 \mu\text{m}$, the width of the lead wire 2 is $10 \mu\text{m}$, the center distance of electrodes is $100 \mu\text{m}$, is formed. Next, negative photosensitive polyimide (hereinafter abbreviated to NPI) is made spin coating as an insulating layer so that the thickness after drying is $1 \mu\text{m}$ and the insulating layer pattern is made the exposure formation so that holes 3 of diameter $10 \mu\text{m}$ are made at the centers of several electrodes of the wiring element.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報(A) 平4-204244

⑤ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)7月24日

G 01 N 27/30
C 12 M 1/34F 7235-2 J
Z 9050-4 B

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全5頁)

⑭ 発明の名称 一体化複合電極

⑯ 特 願 平2-337973

⑰ 出 願 平2(1990)11月30日

⑱ 発 明 者	杉 原	宏 和	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑱ 発 明 者	光 亦	忠 泰	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑱ 発 明 者	竹 谷	誠	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 出 願 人	松下電器産業株式会社		大阪府門真市大字門真1006番地	
⑲ 代 理 人	弁理士 小鍛治 明		外2名	

明 細 書

1. 発明の名称

一体化複合電極

2. 特許請求の範囲

(1) 絶縁基板上に、最近接の電極間距離が相等しい複数個の電極を備え、前記電極からリード線を放射状に配設した配線部と、前記配線部上の前記電極上に孔を有した絶縁層とを設けたことを特徴とする一体化複合電極。

(2) 最近接の電極間距離が 10～1000 μmである請求項1記載の一体化複合電極。

(3) 電極の大きさが正方形若しくは円形であって、一辺の長さ若しくは直径が15～20 μmである請求項1記載の一体化複合電極。

(4) 孔の大きさが電極の大きさ以下である請求項1若しくは3何れかに記載の一体化複合電極。

(5) 複数個の電極中心部が 6×6の格子状の各交点に位置する請求項1記載の一体化複合電極。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、生体活動の電気的計測、特に神経細胞の電気的活動を計測する神経電気生理の分野で用いる、多電極を有する一体化複合電極に関する。

従来の技術

従来、神経細胞の電気的活動を計測するには、ガラス電極等からなる記録電極と、金属電極等からなる刺激電極とを各々細胞内または細胞間に挿入し、刺激電極より刺激電流(または電圧)を加えた際の、神経細胞の電気的活動を記録電極により計測するのが普通であった。

これ以外にも、例えば細胞体をガラス吸引電極で突き刺し、細胞体の内部をガラス吸引電極中の液で還流し、このガラス吸引電極から電気信号を与えて細胞を観察する所謂細胞内還流法等多数の変法がある。

発明が解決しようとする課題

上述した従来の技術およびその変法においては、主に空間的な制約と操作精度上の制約で、1つの

サンプル中に一度に2本以上の記録電極を挿入し、神経細胞の電気的活動を記録する多点同時計測は非常に困難であるという課題があった。

測定点が増えるに従って、困難さの度合いが増加し、多細胞間の観測ができ難いという課題があった。

本発明は、多点同時計測を簡便に行い、多細胞間に渡る信号伝達観察を可能ならしめる一体化複合電極を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

本発明は、絶縁基板上に、最近接の電極間距離が相等しい複数個の電極を備え、前記電極からリード線を放射状に配設した配線部と、前記配線部上の前記電極上に孔を有した絶縁層とを設けた一体化複合電極のよって、上記課題を解決したものである。

作用

本発明の一体化複合電極上に培養した細胞に信号を与え、同時に細胞間の信号の伝達を計測する際に、最近接の電極間距離を調整し、しかもこの

電極間を等間隔で並べることにより、一細胞体が電極上に配置し、この細胞体から伸びた細胞突起を介した細胞体が、隣合う電極上に位置する確率が高くなる。したがって、隣合う細胞体間の信号の伝達を検知できる。

また、電極から伸ばしたリード線を放射状に配設することにより、リード線間の容量成分がなくなり、ノイズが減少し測定精度が向上する。

実施例

本発明に供される基板材料としては、細胞培養後顕微鏡観察するため透明な基板が好ましく、石英ガラス、鉛ガラス、ホウ珪酸ガラス等のガラス、若しくは石英等の無機物質、または有機ガラス等の有機物質が挙げられるが、機械的強度と透明性とを加味すると無機物質が好ましい。

本発明に供される電極材料としては、例えば酸化インジウム錫 (ITO)、酸化錫 Cr、Au、Cu、Ni、Al等が使用可能である。ただし、ITO若しくは酸化錫を用いると、電極はわずかに黄色を帯びた透明なものとなり、神経細胞の顕

微鏡下での視認性が良く、実験操作上有利であるが、とりわけITOが良導電性であるため望ましい。

リード線材料にも同様の材料が適応でき、やはり電極材料と同様の理由でITOが好ましい。

また、本発明の供される絶縁層材料としては、例えばポリイミド (PI) 樹脂、エポキシ樹脂、アクリレート樹脂、ポリエステル樹脂、或はポリアミド樹脂等透明な樹脂が挙げられる。

これらの樹脂は、配線部上に通常の手法によって塗布して絶縁層が構成される。なお、絶縁層材料が光照射重合性であると、パターン形成が可能となるため好ましい。

特に、絶縁層材料がPIであり培養する細胞が培養神経細胞である場合には、良好な生育を示すため望ましい。さらにPIの中でも、ネガティブフォトセンシティブポリイミド (NPI) が、半導体のパターン形成と同様に、配線部に塗布した後フォトエッチングプロセスを用いて孔を形成できるため好ましい。

また、絶縁層の厚みは、絶縁性が付与できる程度であればよく、特に限定するものではないが、通常0.1～10μmが好ましく、1～5μm程度がさらに好ましい。

本発明の一体化複合電極は、直接細胞を培養して細胞の電気活動を計測記録する。培養条件若しくは細胞の種類によって、細胞体の大きさ若しくは細胞突起の長さが異なるが、一体化複合電極の最近接の電極間距離は、10～1000μmが好ましい。電極間距離が10μm未満であると、互いに近接し過ぎるため細胞体が細胞突起を介して相隣合う確率が減り、またリード線の配線も困難になる。また、1000μmを越えると、リード線の配線はしやすいが、細胞突起が1000μm程度も伸びることは稀なため、細胞体が電極上に位置する確率が減る。一般の条件で培養した細胞突起の長さは、平均100μm程度であるため、電極間距離も100μm程度が望ましい。

電極の形状は、最近接の電極間距離を一定にする要請のため、正方形か円形が好ましく、細胞体

の形状は一般には球状体なので円形状の電極が好ましい。また、電極の大きさは、培養する細胞体の大きさ程度が好ましく、正方形の電極の場合一辺が $15 \sim 20 \mu\text{m}$ 、円形状の電極の場合直径が $15 \sim 20 \mu\text{m}$ が好ましい。

さらに、本発明の一体化複合電極の絶縁層中の孔は、一体化複合電極上で培養した細胞体に電気信号を与えて刺激させると同時に、隣合う細胞体から刺激信号を検知するため、電極を露出させる目的で形成し、電極中心部に位置する。この孔の大きさは、電極以下の大きさを有すればよく、 $5 \sim 20 \mu\text{m}$ 程度が好ましい。

また、本発明の一体化複合電極の電極中心部が同心円状若しくは 6×6 の格子状の各交点に位置する構成であると、リード線を放射状に配線でき、特に 6×6 の格子状の場合はリード線の配線の構成が簡単に行うことができるため好ましい。

以下具体的実施例で、本発明の一体化複合電極をさらに詳細に説明する。

実施例 1

$0.0 \mu\text{m}$ の配線部を形成した。

次いで、絶縁層としてネガティブフォトセンシティブポリイミド（以下NPIと略す）を、乾燥後の厚みが $1 \mu\text{m}$ となるようにスピンコートし、第2図に示すように配線部の各電極の中心に直径 $10 \mu\text{m}$ の孔3ができるように、絶縁層パターンを露光形成させた。

リードレスチップキャリアパッケージ実装用ソケットとの接点は、金およびニッケルでコートし、耐久性を向上させた。さらに、電極1の部分に 1% の塩化白金(IV)酸六水和物と 0.01% 酢酸鉛の混合水溶液に電極を浸漬し、 50 mA/cm^2 の電流を 30 s 間通電し電極表面に白金黒を析出させる所謂プラチナイズすることで、インピーダンスを低下させた後、以下の実験に供した。

なお、本実施例では電極1およびリード2の部分にITO、絶縁層にNPIを用いたが、用いる材料はこれらに限定されないことは既に述べた。

また、本発明の一体化複合電極を構成するためのプロセスは本実施例の方法に限定されない。

先ず、複合電極配線部の作製について述べる。

一体化複合電極の基盤は機械的強度の強い透明な絶縁素材として、厚さ 1 mm の硬質ガラス（IWAKI CODE 7740 GLASS（岩城硝子（株）製）以下同じ）を用いた。

配線部外寸は、リードレスチップキャリアパッケージ実装用ソケット（75 SERIES（山一電機工業（株）製））に適合するものとした。

電極およびリード線の材料にはITOを用い、IWAKI CODE 7740 GLASS上に約 1000 \AA 厚にコートし、その後洗浄した。

次に、第1図に示すような 6×6 の格子上の各交点に電極の中心部が位置し、各電極の最近接の電極の中心間距離が等しく、しかもリード線が放射状に伸びた形状の電極1およびリード線2のパターンになるように、フォトリソを用いて露光し、純水50、塩酸50、硝酸1の体積比で混合した溶液でITOをエッチングした後、フォトリソを除去した。電極1の直径は $15 \mu\text{m}$ 、リード線2の幅は $10 \mu\text{m}$ 、電極中心間距離は 1

実施例 2

次に、一体化複合電極上での神経細胞の培養について述べる。

実施例1のようにして構成した一体化複合電極上で、神経細胞としてラット大脳視覚皮質を培養した。

以下、培養法について詳細に述べる。

(イ) 生後2、3日を経過したSDラットの脳を摘出し、氷冷したハンクス液に浸す。

(ロ) 氷冷ハンクス液中の脳から視覚皮質を切り出し、イーグルの最小必須培地（以下MEMと略す）液中に移す。

(ハ) MEM液中で、視覚皮質をできるだけ細かく、最大でも 0.2 mm 角となるように、切断する。

(ニ) 細かく切断した視覚皮質を遠沈管に入れ、カルシウムおよびマグネシウムを含まないハンクス液（CMFハンクス液）で3回洗浄した後、適量の同液中に分散する。

(ホ) 上記(ニ)の遠沈管中に、トリプシンの

CMFハンクス溶液(0.25重量パーセント)を加え、全量を倍にする。緩やかに撹はんしながら、37℃で15分から20分間恒温状態に保ち、酵発反応をおこなわせた(即ちインキュベート)。

(ヘ)牛胎児血清(FCS)10%を含むダルベッコ変更イーグル培地とF-12培地とを1対1の体積比で混合したDMEM/F12混合培地を、上記(ホ)を経た遠沈管中に加え、全量をさらに倍にする。先端をバーナーであぶり口徑を小さくしたパスツールピペットで、緩やかにピペティングを繰り返し(最大20回程度)、細胞をほぐす。

(ト)9806.65m/s²(即ち1000g)で約5分間遠心分離を行う。遠心分離終了後、上清を捨て、沈殿をFCS5%を含むDMEM/F12混合培地に混濁する。

(チ)上記(ト)の混濁液を、再び1000gで5分間遠心分離する。

(リ)上記操作(ト)および(チ)をあと2回(計3回)繰り返す。

(ヌ)最終的に得られた沈殿を、1mlの5%FCSを含むDMEM/F12混合培地に混濁し、混濁液中の細胞濃度を赤血球勘定板を用いて計測する。同様の培地を用いて細胞濃度を $2 \sim 4 \times 10^4$ 個/mlになるように調整する。

(ル)一体化複合電極上に直径12mm、高さ7mmのプラスチック製円筒を、複合電極の中心と円筒の中心を合わせて接合することにより構成した細胞培養用ウェル中に、あらかじめ5%FCSを含むDMEM/F12混合培地500μlを加え、CO₂インキュベータ内(O₂濃度95%、CO₂濃度5%、湿度97%、温度37℃)で暖めておく。

(ヲ)上記(ル)のウェル中に細胞濃度を調整した混濁液100μlを静かに加え、再びCO₂インキュベータ内に静置する。

(ヨ)上記(ル)の操作より3日後に、培地の半量を新しいものと交換する。交換培地はFCSを含まないDMEM/F12混合培地を用いる。

(タ)以降、4~5日毎に上記と同様の培地交

換を行う。

これら一連の操作により、一体化複合電極上でラット大脳視覚皮質の神経細胞を培養することができた。

細胞は絶縁層(PI)上でもプラチナ化された電極上でも良好に生育した。

したがって、適当な位置にある電極を刺激電極または記録電極として用いれば、神経細胞電気活動の同時多点計測が可能であった。

なお、神経細胞の培養法は本実施例以外にも多数の変法があり、本実施例に限定されるものではない。

発明の効果

本発明は、絶縁基板上に、最近接の電極間距離が相等しい複数個の電極を備え、前記電極からリード線を放射状に配設した配線部と、前記配線部上の前記電極上に孔を有した絶縁層とを設けた一体化複合電極を用い、この上での神経細胞の培養が可能であった。

さらにこの電極を用いれば、従来不可能または

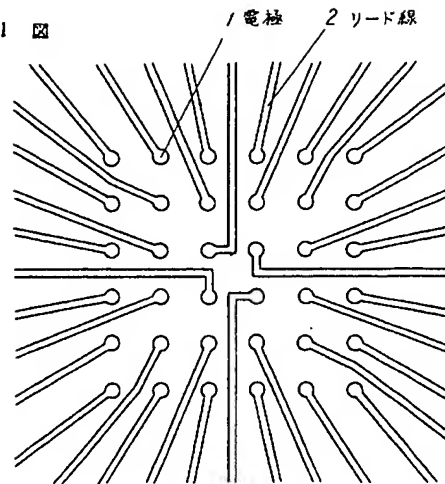
非常に困難であった神経細胞電気活動の同時多点計測及び多細胞に渡る信号伝達観察が実現できる効果がある。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の一体化複合電極の一実施例の配線部のパターン上面図、第2図は本発明の一体化複合電極の一実施例の絶縁層のパターン上面図である。

代理人の氏名 弁理士 小銀治明 ほか2名

第 1 図



第 2 図

